Häufigkeit von Plasmiden mit gekoppelter Streptomycin- und Sulfonamid-Resistenz vom Typ rBP1

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Wolfram Kalthofen
aus La Paz-Bolivien

Bonn 1980

Häufigkeit von Plasmiden mit gekoppelter Streptomycin- und Sulfonamid-Resistenz vom Typ rBP1

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Wolfram Kalthofen
aus La Paz-Bolivien

Bonn 1980

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: *Prof. Dr. B. Wiedemann*
2. Gutachter: *Prof. Dr. K. E. Schneweis*

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Immunologie (Abteilung Medizinische Mikrobiologie für
Pharmazeuten) der Universität Bonn

Direktor: *Prof. Dr. H. Brandis*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: R. Schwarzbold, 5305 Witterschlick b. Bonn

Meinen Eltern, Brüdern,
Elizabeth
und
Mareile

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	8
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1. Untersuchte Stämme	12
2.2. Laborstämme und Standard-Plasmide	12
2.3. Chemikalien und Sonstiges	13
2.4. Lösungen	14
2.5. Nährmedien	15
2.6. Geräte	16
2.7. Resistenzbestimmung durch den Agardiffusionstest, Antibiogramm	17
2.8. MHK-Bestimmung in Isosensitest-Bouillon	17
2.9. Konjugation	18
2.10. DNA-Präparation	18
2.11. Agarosegelelektrophorese	19
2.12. Transformation	20
2.13. Freeze-Squeeze-Methode	21
2.14. EB/CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	22
2.15. Enzymverdauungen	22
2.16. Enzymbestimmung	25
3. ERGEBNISSE	29
3.1. Herkunft der Bakterien	29
3.2. Häufigkeit der Resistenzdeterminanten	29

Seite

3.3. Resistenz-Bestimmung 31

3.4. Enzymuntersuchung 32

3.5. Konjugation 34

3.6. DNA-Präparation 34

3.7. Gelelektrophorese 35

3.8. Transformation 40

3.9. Charakterisierung der aus den Transformanten isolierten Plasmide durch Restriktionsenzyme 42

4. DISKUSSION 46

5. ZUSAMMENFASSUNG 50

6. LITERATURVERZEICHNIS 51

ABKÜRZUNGEN

Antibiotika:	Ap	Ampicillin
	Carb	Carbenicillin
	Cm	Chloramphenicol
	Gm	Gentamycin
	Km	Kanamycin
	Nx	Nalidixinsäure
	Sm	Streptomycin
	Spec	Spectinomycin
	Su	Sulfonamid
	Tc	Tetracyclin
	Tob	Tobramycin

AAD	Aminoglykosid-Adenyltransferase
APH	Aminoglykosid-Phosphotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
EB	Ethidiumbromid
cpm	Impulse pro Minute
DTT	Dithiotreitol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
h	Stunde(n)
IST	Isosensitestbouillon
kb	Kilobasen
lac^+	Lactose wird unter Säurebildung abgebaut
M	molar
mA	Milliampere
Mdal	Megadalton
mg	Milligramm
M.H.	Müller Hinton
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
nm	Nanometer

N.D.	nicht getestet
PBD	2-(4-tert-Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazole
r	resistent
R-	Resistenz-
recA	allgemeine Rekombination
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RTF	Resistenztransferfaktor
s	sensibel
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Zpm	Umdrehungen pro Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
UV	Ultraviolett
V	Volt

1. EINLEITUNG

Seit Bestehen der Chemotherapie stellt die Resistenz der Mikroorganismen gegen die eingesetzten Substanzen ein Dauerproblem dar. Eine besondere Rolle beim Entstehen resistenter Stämme spielt die Selektion resistenter Organismen durch Chemotherapeutika. Je häufiger und je wahlloser Chemotherapie betrieben wird, umso mehr treten Stämme mit erworbener Resistenz auf und verdrängen empfindliche Populationen.

Primär sensible Bakterien können durch zwei verschiedene Mechanismen resistent werden:

1. durch Mutation bestimmter Gene auf dem Chromosom (*LURIA, DELBRÜCK*, 1943)
2. durch Erwerb zusätzlicher genetischer Information, sogenannter Resistenz-Plasmide (*WATANABE*, 1963).

Die Wahrscheinlichkeit einer Mutation bewegt sich zwischen 10^{-7} und 10^{-12} (*KAYSER*, 1977); hinzu kommt, daß für die Entstehung der chromosomalen Resistenz meist mehrere Mutationsschritte notwendig sind. Diese erworbene Resistenz hat aber zur Folge, daß ursprüngliche Eigenschaften teilweise oder vollständig verloren gehen. Schon bei einer Einschrittmutation - wie bei der Streptomycinresistenz - ist eine Einschränkung der Lebensfähigkeit der Zellen zu beobachten. Bei einer Mehrfachresistenz sind vermutlich so viele Stellen auf dem Chromosom verändert, daß die Lebensfähigkeit des Wirtsbakteriums noch um ein Vielfaches mehr eingeschränkt wird (*WIEDEMANN*, 1974). Diese "neuen" resistenten Bakterien überstehen den Selektionsdruck des Chemotherapeutikums, während die an sich lebensfähigeren nicht-resistenten Zellen abgetötet oder am Wachstum gehindert werden.

Zellen, die ein Resistenz-Plasmid erwerben, erhalten eine zusätzliche Information ohne Verminderung ihrer Lebensfähigkeit, da das Chromosom unverändert bleibt. Sie sind somit den Bakterien mit chromosomaler Resistenz überlegen. Darüber hinaus wird die Verbreitung R-Faktor-tragender Organismen weiter begünstigt, weil bei

Einwirkung eines Antibiotikums gleichzeitig auch Resistenz gegen andere Chemotherapeutika selektiviert werden kann.

Aus den vorangegangenen Darlegungen wird deutlich, warum die Resistenz gegen die Arzneimittel hauptsächlich durch plasmidtragende vielfach-resistente Bakterien verursacht wird.

Resistenzeigenschaften können sich auf verschiedene Arten ausbreiten:

auf molekularer Ebene durch Konjugation
Transduktion
Transformation
Transposition;
auf bakterieller Ebene durch Kontamination.

KONJUGATION ist die Übertragung von Erbmaterial bei Bakterien von einer Donor- auf eine Rezeptorzelle während eines direkten Zellkontaktes zwischen zwei Zellen.
Dieser parasexuelle Mechanismus von Bakterien wurde von *LEDERBERG* und *TATUM* 1946 entdeckt und durch eine Reihe von Arbeiten des Ehepaares *LEDERBERG*, von *HAYES*, *JACOB* und *WOLLMANN* in seinen wesentlichen Grundlagen geklärt.
Die Konjugation ist zwar ein sehr seltener Vorgang, der aber trotzdem in der Darmflora des Menschen eine gewisse Bedeutung hat.

TRANSDUKTION ist die Übertragung von DNA unter Bakterien durch Bakteriophagen.
Dieser zweite parasexuelle Prozeß bei Bakterien wurde 1952 von *ZINDER* und *LEDERBERG* entdeckt.
Die Transduktion ist bei Staphylokokken die übliche Art der Resistenzübertragung, da diese extrachromosomale Plasmide ohne RTF-Anteil besitzen.

TRANSFORMATION ist die Übertragung einer vorher aus Bakterien isolierten DNA in einen Rezipienten.
Die ersten Transformationsversuche machten *GRIFFITH* 1928 und *DAWSON* 1931.
Für die natürliche Ausbreitung der Resistenz ist die Transforma-

tion wahrscheinlich unbedeutend, da die "ungeschützte" DNA sofort von den überall in der Natur vorkommenden Nukleasen abgebaut wird.

TRANSPOSITION ist der Vorgang, bei dem diskrete DNA-Segmente (Transposons) unabhängig vom recA-System der Wirtszelle von einem Replikon auf ein anderes übergehen, d.h. sie können in Plasmide, ins Chromosom oder in Phagen-DNA integrieren (*CAMPBELL et al.*, 1979). Auf Transposons können u.a. Gene lokalisiert sein, die Resistenz gegen ß-Lactam- und Aminoglykosid-Antibiotika, gegen Sulfonamide, Chloramphenicol und Tetracyclin verursachen.

Die KONTAMINATION, d.h. die Infektion mit resistenten Bakterien, wird bei Personengruppen mit engem Kontakt und bei hygienisch nicht einwandfreien Bedingungen gefördert (*HENZEL*, 1976).

Von klinischer Bedeutung ist die Tatsache, daß R-Faktoren auf sensible Bakterien übertragen werden können und letztere sich so einer wirksamen Therapie entziehen. *OCHIAI* (1959) und *AKIBA* (1960) fiel dieses Phänomen zuerst auf, als bei einzelnen Patienten gleichzeitig Shigellen und Escherichia coli-Stämme isoliert wurden, die das gleiche Resistenz-Muster aufwiesen. Der Nachweis der Übertragung im Darm der Patienten wurde damals nicht erbracht, da nur eine Bestimmung der R-Determinanten in den verschiedenen Wirtsstämmen erfolgte; die Gleichheit der R-Faktoren wurde nicht bewiesen.

SMITH (1969) und *ANDERSON* (1973) konnten in Versuchen die Übertragung in der Darmflora von Versuchspersonen zeigen; sie war allerdings nur unter gleichzeitiger Antibiotika-Therapie nachweisbar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Verbreitung der Plasmide vom Typ rBP1 untersucht werden, welche eine Streptomycin- und eine Sulfonamid-Resistenz tragen. Diese Plasmide waren deshalb von Interesse, weil Streptomycin mit ca. 25% ein sehr häufiger Resistenzmarker in klinischen E.coli-Isolaten ist (*PEG*, Arbeitsgemeinschaft Resistenz, 1978). Dieses Ergebnis steht im krassen Gegensatz zum geringen Selektionsdruck in der Chemotherapie, denn heute wird Streptomycin fast ausschließlich als Kombinationspräparat in der

Tuberkulose-Therapie eingesetzt, ferner bei den selten auftretenden Infektionskrankheiten mit Brucellen, Pasteurellen pestis, Malleomyces mallei und bei der Endocarditis lenta (Streptococcus viridans, Enterokokken) (*WALTER, HEILMEYER*, 1975).

VAN TREECK (1977) entdeckte das Plasmid rBP1 in drei von vier untersuchten E.coli-Stämmen, die *ERBACHER* und *LAMBRECHT* 1977 von einer gesunden Versuchsperson isoliert hatten. Er untersuchte das Plasmid molekularbiologisch und fand, daß es sich um ein nicht-konjugatives Plasmid mit einem Molekulargewicht von 4.1 Mdal handelt, das durch das Restriktionsenzym EcoRI einmal geschnitten wird.

TETZLAFF (1979) isolierte das die Streptomycinresistenz bedingende Enzym und stellte durch Messung des Einbaus von radioaktiv markiertem ATP in Streptomycin fest, daß es sich bei dem inaktivierenden Enzym um eine Aminoglykosid-Phosphotransferase APH-(3") handelt.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß Plasmide vom Typ rBP1 in klinischen Bakterienisolaten verbreitet sind. Dabei sollte die Resistenz von 130 E.coli-Stämmen, die von Patienten der Universitätskliniken Bonn isoliert wurden, gegen Streptomycin und Sulfonamid bestimmt werden. Bei resistenten Bakterienstämmen sollten die Streptomycin-inaktivierenden Aminoglykosid-Transferasen isoliert und charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte festgestellt werden, ob die Resistenz auf einem Plasmid kodiert ist, das dem rBP1 entspricht. Hierzu sollten das Molekulargewicht und die Schnittstellen mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI, PSTI und HindII ermittelt werden.

2. *MATERIAL UND METHODEN*

2.1. *Untersuchte Stämme*

Die zu prüfenden Escherichia coli-Stämme sind im Rahmen der Studien der Arbeitsgemeinschaft "Resistenz" der Paul-Ehrlich-Gesellschaft im November 1976, Mai 1977 und November 1977 isoliert worden.

Die "Arbeitsgemeinschaft Resistenz" der Paul-Ehrlich-Gesellschaft versucht,durch mehrjährige Erhebungen, die in ausgewählten, über die Bundesrepublik Deutschland, Österreich und die Schweiz verteilten Instituten mit einheitlicher Methodik ausgeführt werden, das gegenwärtige Ausmaß sowie regionale und zeitliche Schwankungen der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika human- und veterinärmedizinisch wichtiger Bakteriengruppen zu erfassen. Die Analyse derartiger Daten soll Tendenzen in der Resistenzentwicklung rechtzeitig aufdecken und auch zum Verständnis der jeweils vorherrschenden Mechanismen der Ausbreitung resistenter Bakterien beitragen (*PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT, ARBEITSGEMEINSCHAFT "RESISTENZ"*, 1978).

2.2. *Laborstämme und Standard-Plasmide*

Als Rezipient bei den Konjugations- und Transformationsexperimenten wurde E.coli K12 W3110, $Nx^{r}lac^{-}$ verwendet (*GRINSTED et al.*, 1972).
Das Plasmid JR66 (*BENVENISTE et al.*, 1971) codiert drei Aminoglykosidtransferasen, die Adenyltransferase AAD-(2") und die beiden Phosphotransferasen APH-(3')II und die APH-(3"). Die APH-(3") inaktiviert Streptomycin und wird bei Untersuchungen der Enzyme aus resistenten Wildstämmen zum Vergleich mitgetestet.

Die Marker-Plasmide pRI46, rBP1, RSF1010 und Co1E1 ermöglichen die Molekulargewichtsbestimmung der aus den Wildstämmen isolierten Plasmide.

Tab.1 gibt eine Übersicht über ihre Bezeichnungen und Eigenschaften wieder.

Tab.1. Marker-Plasmide

Bezeichnung des Trägerstammes	chromosomale Gene	Bezeichnung des Plasmids	Plasmidgene	Literatur
E.coli W3110N (M46)	lac^+	pRI46	Tra^+ [1] Ap^rSu^r kryptisch [2]	*VAN EMBDEN* (1978)
E.coli W3110	lac^-	rBP1	Sm^rSu^r	*VAN TREECK* (1977)
E.coli 1485F$^-$		RSF1010	Sm^rSu^r	*ANDERSON, LEWIS* (1965) *HEFFRON et al.* (1975)
E.coli JC411		Co1E1	Cel [3]	*HERSHFIELD et al.* (1974)

[1] Tra^+: Transfergene des Resistenz-Transfer-Faktors

[2] kryptisch: Gene, von denen der Phänotyp unbekannt ist

[3] Cel: Plasmid bildet ColicinE1

2.3. *Chemikalien und Sonstiges*

Ethidiumbromid reinst	Serva International, Heidelberg
Agarose Standard (Seakem) (Pure Powder)	Marine colloids inc., USA
Visking Dialysierschlauch	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Trizma Baze (Tris)	Sigma Chemical Company, St. Louis/USA
Dithiotreitol (DTT)	Sigma Chemicals, München
Toluol	Baker
tert-Butyl-PBD	Zinsser, Frankfurt
Whatman P 81-Papier	Hornmuth und Vetter
(8-^{14}C) Adenosin-5'-Triphosphat (Aktivität: 1 mCi/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig

Adenosin-5'-(γ-^{32}P)-Triphosphat (Aktivität: >10 Ci/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig

Die übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Enzyme:

RNase (aus Rinderpankreas)	Boehringer GmbH, Mannheim
Lysozym (15.000 E/mg)	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonucleasen:	
EcoRI (aus E.coli BS 5)	Boehringer GmbH, Mannheim
PSTI (aus Providencia startii)	"
HindII (aus Haemophilus influenzae)	Miles Laboratories

Chemotherapeutika:

Testblättchen:

Nalidixinsäure (30 µg)	Oxoid, Wesel
Streptomycin (10 µg)	"
Sulfonamid (25 µg)	"
Spectinomycin (10 µg)	"

Substanzen:

Nalidixinsäure	Winthrop Laboratories, Newcastle, England
Streptomycin	Bayer, Leverkusen
Sulfonamid	Hoffmann La Roche AG, Grenzach
Spectinomycin	Upjohn Kalamazoo, Michigan

2.4. Lösungen

Tris-Borat-Puffer (Peacock-Puffer)	0.089 M Tris 0.0025 M EDTA 0.0089 M Borsäure
Stop-Mix	0.07% Bromphenolblau 7% SDS 33% Glycerol
Stop-Lösung	7 M Harnstoff 50% Saccharose 0.1 mM EDTA, pH= 7.0 0.1% Bromphenolblau

Tes-Puffer	0.03 M Tris 0.05 M NaCl 0.005 M EDTA pH= 8.0
Verdünnungspuffer	10 mM KH_2PO_4 0.2 M NaCl 1 mM EDTA 0.7 mM Mercaptoethanol 2 mg/ml Rinderserumalbumin 0.2% (v/v) Triton X 100 pH ca. 7
Waschflüssigkeit	0.01 M Tris 0.03 M NaCl pH= 7.8
Osmotisches Medium	20% Saccharose 0.033 M Tris 0.003 M EDTA pH= 7.3
Schockmedium	0.0005 M $MgCl_2$
DTT-Lösung	12.3 mg DDT ad 2.0 ml H_2O dest.
Scintillationsflüssigkeit	1000.0 ml Toluol 6.0 g tert-Butyl-PBD
Mixture	3.3 µmol Tris-HCl-Puffer, pH= 7.5 0.5 µmol $MgCl_2$ 0.066 µmol DTT in insgesamt 20 µl

Chemotherapeutika-Stammlösungen:

Streptomycin-Lösung	2.0 mg Sm in 1 ml 0.9% NaCl
Sulfonamid-Lösung	20.0 mg in 1 ml 0.1N NaOH
Nalidixinsäure-Lösung	2.0 mg Nx und 20 mg Tris in 1 ml 0.9% NaCl

2.5. *Nährmedien*

Standard I Nährbouillon (NI) (Merck)	15.6 g Spezialpepton 2.8 g Hefeextrakt 5.6 g NaCl 1.0 g D(+)-Glukose

Müller-Hinton-Bouillon (Merck)	5.0 g Fleischinfus. 17.5 g Caseinhydrolysat 1.5 g Stärke
Isosensitest-Bouillon (Oxoid)	23.4 g in 1 l H_2O dest.
Müller-Hinton Agar (Merck)	1 l Nährbouillon 12.5 g Agar Agar
Chinablau-Lactose Agar	3.0 g Fleischextrakt 5.0 g Pepton aus Casein 10.0 g Laktose 0.375 g Chinablau 5.0 g NaCl 12.0 g Agar Agar

Die genannten Mengen wurden in 1 l aqua dem. gelöst, sorgfältig gemischt und 20 min bei 121°C autoklaviert.

2.6. Geräte

Photometer Riele MK 2 plus Zusatzgerät SR 200	Robert Riele KG, Berlin
Ultrazentrifuge Vacufuge, Typ 6100	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Cyrofuge 20-3, Typ 5915 mit Festwinkel- und Schwenkrotor	"
Power Supply Labpac B 605 D	Oltronix GmbH, Baden-Boos
Universal UV Lampe	Camag, Berlin
Refraktometer	Bleeker, Zeist, Niederlande
Szintillationszähler betaszint BF 5000 plus Rechnersystem	Berthold, Wildbad
pH-Meter CG-711	Schott, Mainz
Mikrotiterplatten System Cooke M220-24a	Greiner, Nürtingen
Plattengelelektrophoresegeräte	institutseigene Anfertigung

Fotografiermaterial:

Kamera: Leica DBP	Leitz, Wetzlar
Reprovit IIa	"
Focomat IIc	"
Film: Agfa Ortho, Professional	Agfa

Filter: Kodak Wratten, Nr. 9, 75 x 75 mm	Kodak
Filmentwickler: Documol flüss.	Tetenal-Photowerk, Hamburg-Berlin
Filmfixierer (250 g Natriumthiosulfat und 50 g Kaliumpyrophosphat in 2 l aqua dem. gelöst)	eigene Herstellung

2.7. *Resistenzbestimmung durch den Agardiffusionstest, Antibiogramm (WIEDEMANN, 1978)*

Eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes wurde in 4.5 ml Müller-Hinton-Bouillon übergeführt und diese 4 Stunden unter Schütteln bei 37°C bebrütet.
Die Suspension wurde mit 0.9%iger NaCl-Lösung 1:1000 verdünnt. 2 ml dieser Verdünnung wurden auf die Oberfläche einer Müller-Hinton-Platte (12 cm Durchmesser, 4 mm Schichtdicke) gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt; der Überstand wurde abgesaugt. Anschließend wurden Antibiotika-Blättchen auf die Oberfläche gebracht und mit einer Pinzette leicht angedrückt.
Die Platten wurden ca. 16 Stunden bei 37°C bebrütet und die dann vorhandenen Hemmhofdurchmesser ausgemessen.

2.8. *MHK-Bestimmung in Isosensitest-Bouillon (modifiziert nach WILKINSON, 1978)*

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist die experimentell ermittelte Konzentration eines Stoffes, die unter definierten Bedingungen gerade in der Lage ist, ein sichtbares Wachstum der Bakterien zu verhindern.

Durchführung:

Es wurden je eine Verdünnungsreihe (1:2) von Sulfonamid und Streptomycin in 0.9%iger NaCl-Lösung hergestellt; die Konzentrationen der Stammlösungen betrugen für Sulfonamid 16384 µg/ml und für Streptomycin 1024 µg/ml.
Die Bakterienkulturen wurden in Isosensitest-Bouillon (IST) ange-

züchtet und mit 0.9%iger NaCl-Lösung und IST-Bouillon (letzter Schritt) 1:1000 für die Bestimmung der MHK gegenüber Streptomycin bzw. 1:10000 für die gegenüber Sulfonamid verdünnt.
In die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden dann je ein Tropfen Antibiotikumlösung und ein Tropfen der verdünnten Bakterienkultur gegeben (nochmalige Verdünnung auf 1:2). Die Mikrotiterplatten wurden anschließend im Plastiksack über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.9. Konjugation (SCHIEFERDECKER, 1977)

Sowohl Donor (Teststämme) als auch Rezipient (E.coli W3110) wurden in je 4.5 ml NI-Bouillon bei 37°C unter Schütteln angezüchtet.

Die Donor-Kultur wurde 1:10 mit frischer NI-Bouillon verdünnt. 0.1 ml davon und 1 ml Rezipientenkultur wurden gemischt und in einem Reagenzglas in schräger Lage bei 37°C 4 Stunden bebrütet. Durch die Schräglage wird die Oberfläche der Flüssigkeit vergrößert und damit eine bessere Sauerstoffversorgung der Zellen erreicht.
Je 0.1 ml der Mischkultur und deren 1:10- bzw. 1:100-Verdünnungen wurden auf Selektivantibiotikaplatten ausgespatelt, die mit Sm und Nx bzw. Su und Nx versetzt waren. Die Konzentrationen betrugen für Sm 10 µg, für Nx 20 µg und für Su 200 µg pro ml Agar.

2.10. DNA-Präparation nach MEYERS und FALKOW (1976)

Plasmidhaltige Stämme (4.5 ml-Vorkulturen) wurden über Nacht in 200 ml NI-Bouillon bei 37°C im Schüttelinkubator angezogen und anschließend bei 4°C mit 10.000 Upm 15 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in 7.5 ml 25%ige Saccharose-Lösung in 10 mM Tris, pH= 8.0 resuspendiert.
Die Zellen wurden nach der von *GUERRY et al.* (1973) beschriebenen Methode lysiert, indem man 1 ml Lysozym (1% in 0.25 M Tris, pH=8) zur Zellsuspension gab, mischte und in Eis 15 min inkubierte.

Danach erfolgte Zugabe von 0.5 ml 0.25 M EDTA und erneute Inkubation in Eis für 5 min.
Nun wurden 0.5 ml 20%ige SDS-Lösung zugegeben, gemischt und 10 min in Eis inkubiert.
Zum Schluß gab man noch 5 ml 3 M NaCl-Lösung hinzu (Salzkonzentration = 1 M). Das Ganze wurde für mindestens 4 Stunden (besser über Nacht) in Eis inkubiert.
Die Zelltrümmer und der größte Teil (90%) der chromosomalen DNA wurden bei 4°C und 13.000 Upm 25 min abzentrifugiert und das "cleared lysate" abdekantiert.
Das Volumen des "cleared lysate" wurde mit aqua dest. verdoppelt. RNase wurde in einer Konzentration von 20 µg/ml (5 mg/ml in 50 mM NaAc-Puffer, pH= 5.0, 10 min gekocht) zugegeben und das Lysat für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.
Nach der RNA-Verdauung wurde gleiches Volumen Tris-gesättigtes Phenol zugegeben, um die Proteine zu entfernen (Herstellung des gesättigten Phenols: Phenol schmelzen, ungefähr gleiches Volumen 50 mM Tris hinzugeben, im Scheidetrichter ausschütteln, Phenolphase entnehmen und Vorgang wiederholen). Die Probe wurde sanft geschüttelt und dann 20 min bei 8000 Upm und 20°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mittels Pipette abgehoben und mit 3M Natriumacetat bis zu einer Endkonzentration von 0.3 M versetzt. Dazu wurde doppeltes Volumen 95%iges Ethanol gegeben.
Über Nacht ließ man die DNA bei -20°C präzipitieren; die DNA wurde pelletiert, der Überstand dekantiert und die Ethanolreste im Gefriertrockner entfernt.
Die DNA wurde in 200 µl Tes-Puffer resuspendiert.

2.11. Agarosegelelektrophorese (modifiziert nach MEYERS und FALKOW, 1976)

0.7%ige Agarose wurde in Peacock-Puffer 20 min bis zur Auflösung gekocht und dann im Wasserbad auf 56°C abgekühlt.
Die Gelkammer wurde unten mit ca. 10 ml Agarose abgedichtet und nach deren Erstarrung mit der Agarose ganz aufgefüllt. Durch Einführen eines vielzähnigen Kammes durch die obere Öffnung wurden

Slots (Geltaschen) ausgespart, in die die DNA-Proben eingefüllt wurden. Die Agarose ließ man 1 Stunde erhärten (milchiges Aussehen), entfernte Kamm und unteren Querstab und spannte die Kammer am Elektrophoresegerät fest. Vakuumfett diente zur Abdichtung der Kammer. Das Abrutschen des Gels wurde durch Unterlegen mit Schaumstoff verhindert.
Das Gel wurde mit Tris-Borat-Puffer überschichtet und der Anoden- und Kathodenraum mit demselben Puffer gefüllt.
Die DNA-Proben wurden mit Stop-Mix (ca. 10 µl auf 50 µl Probe) versetzt und in Volumina zwischen 20 und 60 µl in die Slots gegeben.

Bei den großen Gelen wurde 4-6 Stunden bei ca. 200 V und bei den kleinen Gelen 2-3 Stunden bei ca. 100 V elektrophoretisiert; die Stromstärke sollte 50 mA nicht überschreiten.
Nach dem Lauf wurde das Gel in ein Färbebecken mit einer EB-Lösung (0.4 µg/ml) gelegt und für 20-30 min angefärbt.
Unter UV-Licht wurde das Gel ausgewertet und fotografiert; die Wellenlänge des Lichtes betrug 254 nm.

2.12. Transformation

Die hier beschriebene Methode wurde von *MANDEL* und *HIGA* (1970) entwickelt und ist nach *COHEN et al.* (1972) modifiziert. Als Transformationsstamm wurde E.coli 2007e ($Nx^r lac^-$) verwendet, der über Nacht in 10 ml NI-Bouillon angezogen wurde.
Diese Kultur wurde mit 90 ml frischer NI-Bouillon verdünnt und bis zu einer Optischen Dichte $_{578}$ von höchstens 0.85 (noch exponentielles Wachstum) im Schüttelinkubator bei 37°C herangezogen.
40 ml der Kulturlösung wurden etwa 10 min bei 8000 Upm und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in gleichem Volumen 0.01 M NaCl gewaschen.
Dann wurden die Zellen in 40 ml 0°C kalter, 0.03 M $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und 90 min in Eis inkubiert.
Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 8000 Upm und 0°C zentrifugiert und in einem Zehntel des Ausgangsvolumens 0.03 M $CaCl_2$-Lösung resuspendiert.

Zu 0.1 ml der so behandelten, kompetenten Zellen wurden 50 µl Plasmid-DNA in Tes-Puffer und 25 µl 0.1 M $CaCl_2$ hinzugefügt, das Reaktionsgemisch 60 min in Eis inkubiert und anschließend 3 min auf 37°C erhitzt, um die Aufnahme von Plasmid-DNA in die Zellen zu ermöglichen. Entsprechende Kontrollansätze ohne Plasmid-DNA bzw. ohne kompetente Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen behandelt.
Die Inkubationsansätze wurden mit 2.5 ml frischer, auf 37°C angewärmter NI-Bouillon versetzt und mindestens 120 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert, um eine Ausprägung der Antibiotikaresistenz in den Empfängerzellen zu ermöglichen.
Der Erwerb der R-Faktoren wurde durch Ausspateln der Zellen auf Selektivantibiotikaplatten mit Sm und Nx bzw. Su und Nx (Konzentrationen siehe S. 18) nachgewiesen.

2.13. Freeze-Squeeze-Methode

Für eine genauere Identifizierung einer einzelnen Plasmid-Spezies innerhalb aggregierter Gesamtplasmide ist es erforderlich, diese zu isolieren und getrennt zu analysieren.

Eine Möglichkeit hierfür bietet die von *THURING et al.* (1975) beschriebene Freeze-Squeeze-Methode zur Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen.

5 oder mehr Proben der gleichen Gesamtplasmid-DNA wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die verschieden großen Plasmide gelelektrophoretisch getrennt.
Die Banden einer Probe wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und ihre Lage durch Messung der Wanderungsstrecken unter UV-Licht bestimmt; die Lage der nicht angefärbten Banden der anderen Proben konnte dann durch vergleichende Messung ermittelt werden.

Die DNA-Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA aus den anschließend gefrorenen Gelstückchen durch manuelles Ausdrücken der Flüssigkeit, die die DNA enthielt, extrahiert. Wie bei der DNA-Präparation nach *FALKOW* wurde die DNA durch Ethanolfäl-

lung konzentriert.

2.14. *EB/CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (in Anlehnung an GRINSTED et al., 1972)*

Aufgrund der verschiedenen Dichte sedimentieren ccc-Moleküle (s.S.34) der Plasmid-DNA schneller als chromosomale DNA und die oc-Form (s.S.34) der Plasmid-DNA. Sie bilden eine separate, unter der chromosomalen und oc-DNA liegende Bande, die durch Fraktionierung des Gradienten im UV-Licht (260 nm) isoliert wird. Das EB wurde durch Extraktion mit gesättigter CsCl-Lösung und Isopropanol (Probe : CsCl : Isopropanol = 1 : 2 : 4) entfernt; die DNA-Proben wurden anschließend gegen Tes-Puffer über 48 Stunden dialysiert.

In einem 10 ml-Polypropylenzentrifugenröhrchen wurden 7.55 g CsCl, 4.2 ml H_2O dest., 2.0 ml EB (Lösung von 700 µg/ml in 0.1 M Phosphatpuffer, pH= 6.8) und Plasmid-DNA gemischt und mittels Refraktometer auf einen Brechungsindex von 34^{o}-35^{o} Brix eingestellt.

Die Lösung wurde mit Paraffinöl überschichtet, luftfrei verschlossen und 40-48 h bei 42.000 Upm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

2.15. *Enzymverdauungen*

Zusätzliche Aussagen über die Identität von DNA-Molekülen liefert die Gelelektrophorese in Verbindung mit dem Gebrauch von Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme treten bei verschiedenen Bakterienstämmen in Erscheinung; sie zerstören in die Zelle gelangte "fremde" DNA, indem sie für sie spezifische Sequenzen von Nukleotidbasenpaaren erkennen und durch Spaltung v-n Phosphordiesterbindungen charakteristische Schnitte der doppelsträngigen ccc- oder oc-DNA verursachen; die linearen Spaltungsprodukte lassen sich gelelektrophoretisch analysieren.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die eingesetzten Restriktions-

enzyme, ihre Herkunft und die von ihnen erkannten spezifischen Sequenzen von Nukleotidbasenpaaren.

Tab.2. Restriktionsenzyme und ihre Eigenschaften

Restriktionsenzyme	Herkunft	Erkennungssequenzen (*ROBERTS*, 1978)
EcoRI	E.coli BS 5	-G↓AATTC- [1)]
PSTI	Providencia stuartii	-CTGCA↓C-
HindII	Haemophilus influenzae	-GTPy↓PuAC-

[1)] A= Adenin, C= Cytosin, G= Guanin, T= Thymin, Pu= Purin, Py= Pyrimidin

Bei den Enzymverdauungen wurden die aus dem EB/CsCl-Gradienten gewonnenen und gegen Tes-Puffer dialysierten 4- Mdal-Plasmide eingesetzt.
Als Marker-DNA diente λ-DNA, deren durch die Restriktionsenzyme erzeugten linearen Spaltungsprodukte folgende Molekulargewichte aufweisen (Tab.3):

Tab.3. Fragmentgrößen aus EcoRI, PSTI und HindIII-verdauter λ-DNA

Fragment	λ-EcoRI (Mdal [1)]) (*THOMAS, DAVIS*, 1975)	λ-PSTI (Mdal) (*KLAER*, 1978)	λ-HindIII [2)] (Mdal) (*ROBINSON, LANDY*, 1977) (*MURRAY, MURRAY*,1975)
1	13.7	6.825-7.8	14.95
2	4.74	3.185	6.06
3	3.73	2.99	4.13
4	3.48	2.795	2.71
5	3.02	1.85	1.46
6	2.13	1.625	1.3
7		1.586	0.37
8		1.586	0.0715
9		1.378	
10		1.3	
11		1.1	

Forts.Tab.3

Fragment	λ-EcoRI (Mdal [1]) (*THOMAS, DAVIS*, 1975)	λ-PSTI (Mdal) (*KLAER*, 1978)	λ-HindIII [2] (Mdal) (*ROBINSON, LANDY* 1977) (*MURRAY, MURRAY*, 1975)
12		0.75	
13		0.695	
14		0.526	
15		0.34	
16		0.31	
17		0.29	

1) In der Literatur waren die Molekulargewichte in kb (Kilobasen) angegeben. Sie wurden nach der Formel 1 kb = 650 dal (*ROBINSON, LANDY*, 1977) in Mdal umgerechnet.

2) Bei der Verdauung der Testplasmide mit HindII wurde zur Molekulargewichtsbestimmung HindIII-λ-DNA eingesetzt, da die Verdauung von λ mit HindII zu viele Bruchstücke ergibt und eine Molekulargewichtsbestimmung nicht mehr möglich wäre.

Verdauung mit EcoRI (in Anlehnung an *MEYER, GOEBEL*):

Von der Enzymlösung wurde mit Verdünnungspuffer eine 1:30-Verdünnung hergestellt.
5 µl der verdünnten Enzymlösung, 30 µl der in Tes-Puffer gelösten Plasmid- bzw. λ-DNA, 5 µl 0.5 M NaCl, 5 µl 0.1 M $CaCl_2$ und 5 µl 1 M Tris-HCl-Puffer wurden für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert.
Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Stoplösung beendet und das Gemisch in Eis gestellt.
30 µl des Inkubationsansatzes wurden dann zur elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente auf ein Agarosegel (0.7%) aufgetragen.

Die Probe mit den λ-DNA-Fragmenten wurde vorher noch für 5 min auf 65°C erhitzt, um Wasserstoffbindungen an den kohäsiven Enden der Genome - sog. sticky ends - zu trennen (*HERSHFIELD et al.*, 1974).

Verdauung mit PSTI (laut Anweisung des Herstellers):

5 µl unverdünnte Enzymlösung, 5 µl 0.5 M NaCl, 5 µl 0.1 M $MgCl_2$, 5 µl 0.1 M Tris-HCl-Puffer, pH= 7.0 und 25 µl Plasmid- bzw. λ-DNA wurden für 1 h bei 37°C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Stoplösung beendet und das Gemisch in Eis gestellt.
30 µl des Inkubationsansatzes wurden zur Elektrophorese auf 0.7%ige Agarose aufgetragen.

Verdauung mit HindII (laut Anweisung des Herstellers):

2 µl unverdünnte Enzymlösung, 5 µl 0.5 M NaCl, 5 µl 0.1 M $MgCl_2$, 5 µl 0.1 M Tris-HCl-Puffer, pH= 7.9 und 20 µl Plasmid-DNA wurden 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 µl Stoplösung beendet und das Gemisch in Eis gestellt.
30 µl des Inkubationsansatzes wurden zur Elektrophorese auf 0.7%ige Agarose aufgetragen.

2.16. Enzymbestimmung

Ist die Streptomycinresistenz plasmidkodiert, so kann das Streptomycin durch die Phosphotransferasen APH-(3") (*OZANNE et al.*,1969) und APH-(6) (*KIDA et al.*, 1975) oder durch die Adenyltransferasen AAD-(3") (*BENVENISTE et al.*, 1970) und AAD-(6) (*SUZUKI et al.*,1975) inaktiviert werden.

Abb.1 zeigt die Struktur von Streptomycin und Spectinomycin (s.S. 26).

Bei gramnegativen Bakterien treten aber - soweit bisher bekannt - ausschließlich die Phosphotransferase APH-(3") und die Adenyltransferase AAD-(3") auf (*MITSUHASHI et al.*, 1977).

Die Streptomycin inaktivierenden Enzyme wurden nach einem modifizierten Osmotischen-Schock-Verfahren (*NOSSAL, HEPPEL*, 1966) isoliert.

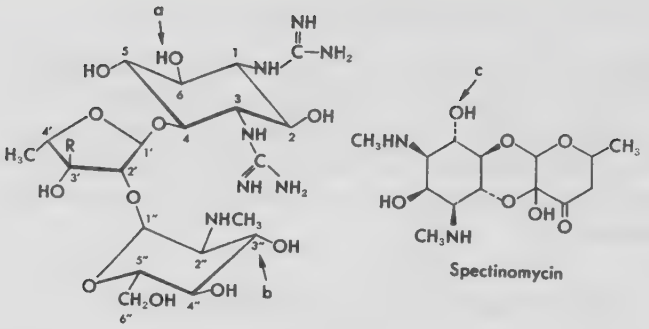

Abb.1. Struktur von Streptomycin und Spectinomycin
Die Pfeile kennzeichnen die Substituenten, die modifiziert werden: a= AAD-(6), APH-(6); b= AAD-(3"), APH-(3"); c= AAD-(3")

1. Der Stamm wurde mindestens 3x über Antibiotika-Platten (10-20 µg Antibiotikum/ml Agarose) gegeben.
2. Eine Kolonie wurde in 4.5 ml NI-Bouillon überimpft, die die gleiche Antibiotika-Konzentration besaß wie die Platten. Die Kultur wurde 12 h bei 37°C bebrütet.
3. 1 ml dieses Inokulums wurde in einem 1 l-Kolben mit 100 ml NI-Bouillon verdünnt und im Schüttler bei 37°C bis zu einer Optischen $Dichte_{550}$ von maximal 1.0 wachsen gelassen (nach 1.5 h bereits nachmessen!).
4. Die Bakteriensuspension wurde 20 min bei 12.000 Upm und 4°C zentrifugiert.
5. Die Pellets wurden 3x mit je 25 ml Waschflüssigkeit gewaschen und jeweils 10 min bei 10.000 Upm und 4°C zentrifugiert.
6. Die Pellets wurden mit 20 ml Saccharose-Lösung (Osmotisches Medium) versetzt und 13 min bei 20°C mit einem Magnetrührer gerührt.
7. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation mit 12.000 Upm bei 4°C.
8. Die überstehende Flüssigkeit wurde abdekantiert und die Pellets

sofort in Eiswasser gestellt.

9. Reste der Saccharose-Lösung wurden sorgfältig mit Wattestäbchen entfernt, ohne den Bodensatz zu verletzen.
10. Die Pellets wurden sofort mit 4 ml einer eiskalten $MgCl_2$-Lösung (Schockmedium) versetzt.
    Die eiskalte $MgCl_2$-Lösung wurde bereitet, indem 25 ml dieser Lösung eingefroren und dann 4 ml beim Auftauen entnommen wurden.
11. Anschließend wurde mit einem Magnetrührer 8 min bei $0^{\circ}C$ gerührt.
12. Danach wurde bei 13.000 Upm und $0^{\circ}C$ zentrifugiert; die überstehende Flüssigkeit enthält das präparierte Enzym.
13. Die Enzympräparation (ca. 4 ml) wurde zu 100 µl Dithiotreitol-Lösung gegeben. Die Enzymlösung sollte schwach gelblich gefärbt sein und beim vorsichtigen Schütteln große Luftblasen bilden, die sich über längere Zeit halten.
14. Die Enzympräparation wurde in Portionen aufgeteilt und bei $-28^{\circ}C$ aufbewahrt.

Der eigentliche Enzymnachweis erfolgte durch Bestimmung der Phosphorylierung bzw. der Adenylierung des Streptomycins mit radioaktiv-markiertem ATP. Bei der Phosphorylierung wurde die terminale Phosphatgruppe vom γ-^{32}P-ATP, bei der Adenylierung das Adenosinmonophosphat (AMP) vom 8-^{14}C-ATP auf das Streptomycin übertragen (s. Abb. 2).

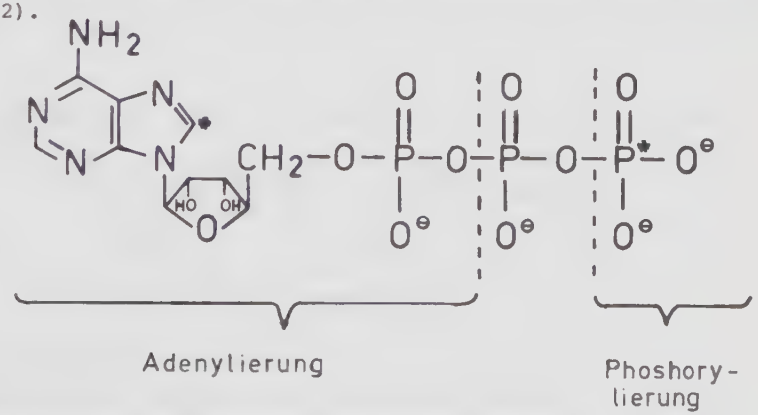

Abb.2. ATP-Molekül mit radioaktiv-markierten Atomen

Das Inkubationsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

20 µl Mixture	$MgCl_2$	0.5 µmol
	DTT	0.066 µmol
	Puffer	3.3 µmol Tris-HCl, pH= 7.5
5 µl Cosubstrat	γ-^{32}P-ATP	20 nmol
	8-^{14}C-ATP	20 nmol
20 µl Antibiotikum = 1 nmol		
25 µl Enzym		
70 µl Gesamtvolumen		

1. Es wurde 30 min bei 34°C inkubiert.
2. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem der Ansatz 1-2 min auf 80°C erwärmt wurde.
3. 50 µl des Inkubationsgemisches wurden auf 2x2 cm große Whatman-P-81-Papierstücke aufpipettiert und 2x8 min in ca. 60 ml H_2O dest. unter Schütteln gewaschen.
4. Die Papierstücke wurden etwa 20 min, evtl. etwas länger, bei 55-66°C getrocknet.
5. Die Papierstücke wurden in Szintillationsfläschchen gelegt, mit 10 ml Szintillationslösung versetzt und die Impulse anschließend im Szintillationszähler gezählt.
6. 1 nmol Inaktivierung von Streptomycin liefert 13.438 cpm.

3. *ERGEBNISSE*

3.1. *Herkunft der Bakterien*

Wie auf S. 12 schon erwähnt, wurde die Untersuchung über die Ausbreitung von Plasmiden vom Typ rBP1 an E.coli-Stämmen der *PEG*-Studien vom November 1976 und Mai/November 1977 vorgenommen.

Das Bakterienkollektiv, das von Patienten der Bonner Universitätskliniken stammt, setzt sich in folgender Weise zusammen:

Tab.4. Zusammensetzung des untersuchten Bakterienkollektivs

	gram(+)	gram(-)				
	Strepto-kokken	E.coli	Kleb-siellen	Pseudomonas aeruginosa	Proteus	Entero-bacter
abs.	52	130	53	35	51	16
%	15.4	38.6	15.7	10.4	15.4	4.7

3.2. *Häufigkeit der Resistenzdeterminanten*

Das Resistenzspektrum der 130 E.coli-Bakterien wurde durch den Agardiffusionstest ermittelt. 8.5% aller E.coli-Stämme waren gegen Sm/Su und 16.9% zusätzlich auch gegen Spec, wie Tab.5 zeigt, resistent.

Tab.5. Häufigkeit von Sm- bzw. Su-Resistenz bei 130 E.coli-Stämmen

	Sm	Su	SmSu	SmSuSpec
abs.	12	10	11	22
%	9.2	7.7	8.5	16.9

Die Unterscheidung zwischen Spec-sensiblen und Spec-resistenten Stämmen mit gleichzeitiger SmSu-Resistenz wurde gemacht, weil die Sm-Inaktivierung in Spec-resistenten Stämmen meist auf eine Adenyl-

transferase und in Spec-sensiblen Zellen, wie bei dem Plasmid rBP1 (*WIEDEMANN et al.*, 1979), auf eine Phosphotransferase zurückzuführen ist.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit Plasmide vom Typ rBP1 identifiziert werden sollten, beschränkte sich die Untersuchung auf 11 E.coli-Stämme (8.9%), die Sm- und Su-resistent waren.
Tab. 6 zeigt, daß 5 Stämme neben Sm/Su keine weiteren Resistenzeigenschaften besaßen, daß die restlichen 6 Stämme immer Tc-resistent waren und in 4 Fällen noch andere Resistenzmarker wie Ap, Carb, Gm, Cm, Km und Tob aufwiesen.

Tab.6. Resistenzmuster der E.coli-Stämme

Stamm	Resistenzmuster								
019632	Sm	Su	Tc	Ap	Carb				
019809	Sm	Su							
019393	Sm	Su	Tc	Ap	Carb				
007870	Sm	Su							
018382	Sm	Su							
018438c	Sm	Su	Tc	Ap	Carb	Gm	Cm	Km	Tob
018488a	Sm	Su	Tc	Ap					
018561	Sm	Su							
018567	Sm	Su	Tc						
018592	Sm	Su	Tc						
018617	Sm	Su							

Die Prüfung der Empfindlichkeit erfolgte dabei mit dem Agardiffusionstest; zur Einstufung der getesteten Bakterien als "resistent", "mäßig empfindlich" und "empfindlich" wurden die Grenzen des DIN-Fachnormenausschusses Medizin DIN 58940 Teil 3 zugrunde gelegt (Deutsches Institut für Normung e.V., 1976).

3.3. Resistenz-Bestimmung

10 der 11 SmSu-resistenten E.coli-Stämme wurden untersucht. Die Resistenzeigenschaften gegen Sm, Su, Spec und Nx wurden überprüft; die Sicherung der Empfindlichkeit der Teststämme gegen Nalidixinsäure war nötig, weil bei den Konjugations- und Transformationsversuchen der Nx-resistente Rezipient E.coli W3110 ($Nx^r lac^-$) verwendet wurde und die Resistenz gegen Nx u.a. als Kriterium für die Unterscheidung von Donor und Rezipient herangezogen wurde.

Als Methode diente der Agardiffusionstest; zusätzlich wurde für Sm und Su die minimale Hemmkonzentration (MHK) in Isosensitest-Bouillon bestimmt.
Die Empfindlichkeit von E.coli W3110 ($Nx^r lac^-$) wurde festgestellt, weil dieser Stamm zu Konjugations- und Transformationsexperimenten verwendet werden sollte.
Die Resistenzeigenschaften von E.coli (rBP1) und E.coli 1485F$^-$ (RSF1010) wurden zum Vergleich mitgetestet.

Tab.7. Bestimmung des Hemmhofdurchmessers im Agardiffusionstest und der minimalen Hemmkonzentration

Stamm	Hemmhof Ø (mm)				MHK (µg/ml)	
	Sm	Su	Spec	Nx	Sm	Su
019632	6	6	28	25	128	8192
019809	6	6	28	24	512	8192
019393	7	6	26	24	128	8192
007870	7	6	27	23	256	8192
018438c	6	6	28	23	256	8192
018488a	8	6	25	25	256	8192
018561	6	6	27	24	256	8192
018567	7	6	25	22	256	8192
018592	8	6	23	26	256	8192
018617	6	6	32	21	512	8192
E.coli (rBP1)	7	6	29	23	512	8192
E.coli (RSF1010) [1)]	6	6	24	6	256	8192
E.coli W3110 ($Nx^r lac^-$)	25	28	22	6	4	4

[1] Die Empfindlichkeitsprüfung bei dem Stamm E.coli 1485F⁻ (RSF 1010) wurde in NI-Bouillon und auf Chinablau-Lactose-Platten durchgeführt, weil der Stamm sowohl im M.H.-Medium als auch im IST-Medium nur schlecht wuchs.

Die Ergebnisse der Antibiogramme stimmen mit denen der PEG-Studie überein; bei den Wildstämmen besteht Resistenz gegen Sm und Su, Sensibilität gegen Spec und Nx.

Vergleicht man die ermittelten MHK-Werte mit den Bewertungsgrenzen des National Committee for Clinical Laboratory Standards (1976) - es stuft MHK-Werte von 15 µg/ml für Sm und 350 µg/ml für Su als resistent ein - so ist erkennbar, daß bei allen Teststämmen hohe Sm- und Su-Resistenzen vorliegen.

3.4. Enzym-Untersuchung

Plasmid-codierte Streptomycinresistenz ist meist auf eine enzymatische Inaktivierung des Moleküls durch Phosphorylierung oder Adenylierung zurückzuführen. Diese periplasmatischen Enzyme werden durch das Osmotische Schockverfahren (s.S.25) isoliert und mit Hilfe des Phosphocellulose-binding Assay (s.S.28) charakterisiert.
Die Sm-inaktivierenden Enzyme aus den 10 zu untersuchenden Stämmen und ebenso die aus den Referenzstämmen, die die Plasmide rBP1 und RSF1010 enthalten, wurden auf diese Weise identifiziert. Zusätzlich wurden je ein Kontrollstamm mit einem Sm-phosphorylierenden Enzym - JR66/W677 - und mit einem Sm-adenylierendem Enzym - E.coli 82 (*TETZLAFF*, 1979) - untersucht. Die Einbaurate von radioaktiv markiertem (^{14}C)-ATP im Fall einer Adenylierung bzw. von (^{32}P)-ATP im Fall einer Phosphorylierung (s.S.27) wurde bestimmt und ist in Tabelle 8 wiedergegeben.
Erläuterung: Die in Tab.8 aufgeführten Prozentwerte beziehen sich auf den maximal möglichen Einbau von (γ-^{32}P)-ATP in das Streptomycin-Molekül unter Berücksichtigung des radioaktiven Zerfalls, der eingesetzten Menge ATP und des Inkubationsansatzes.

Tab.8. Bestimmung der Einbaurate von radioaktiv-markiertem ATP in Streptomycin

Stamm	Einbau von $8\text{-}^{14}C$	Einbau von $\gamma\text{-}^{32}P$ (cpm)	Phosphorylierung %
019632	N.D.	3662	27.25
019809	N.D.	3268	24.32
019393	35	3353	24.95
007870	40	4280	31.85
018438c	37	4059	33.49
018488a	38	3673	27.34
018561	38	3214	23.92
018567	46	5113	38.06
018592	36	3322	24.72
018617	38	5323	39.62
E.coli (rBP1)	N.D.	4099	30.50
E.coli 1485F⁻ (RSF1010)	47	1923	14.31
E.coli JR66/W677	37	4099	25.91
E.coli 82	1108	53	0.4
Kontrolle ohne Enzym	35	54	0.4

Wie Tabelle 8 zeigt, inaktivieren alle Teststämme und die Stämme mit den Plasmiden rBP1, RSF1010 und JR66/W677 Streptomycin durch Phosphorylierung.
Zum Vergleich wurde der Stamm E.coli 82 mitgetestet, da er ein Plasmid enthält, bei dem die Streptomycin-Resistenz durch eine Inaktivierung mittels einer Aminoglykosid-Adenyltransferase bedingt ist (*TETZLAFF*, 1979).

Ein Grund für die unterschiedlichen Werte sind die unterschiedlichen Enzymaktivitäten in den verschiedenen Präparationen.

3.5. Konjugation

Eine Übertragung der Streptomycin- bzw. Sulfonamid-Resistenz von den Teststämmen auf E.coli W3110 gelang in keinem Fall. Bei den Versuchen wurden Konjugationszeiten von 1, 4, 8, 12 und 24 Stunden gewählt.

3.6. DNA-Präparation

VINOGRAD et al. (1965) waren es, die in ihren Experimenten mit doppelsträngigen Viren (Polyoma-Viren), die mit Plasmiden eng verwandt sind, festgestellt hatten, daß DNA-Moleküle in drei Konfigurationen vorliegen können, der ccc-, oc- und der linearen Form.

Die in der DNA-Präparation nach *FALKOW* (Methode s.S.18) isolierten Plasmide liegen hauptsächlich in der ccc-Form vor, wobei durch die Phenolbehandlung ein kleiner Teil in die oc-Form übergeführt werden kann.
Bei den ccc-Molekülen (covalently closed circular) handelt es sich um zirkuläre, doppelsträngige DNA. Wenn sie extrazellulär isoliert werden, erscheinen sie in Form eines "Supercoils", wobei die DNA-Helix um sich selbst gedreht ist. Diese Drehung (Twistung) ist eine spontane Bildung von tertiären Windungen, deren Anzahl von der Größe des Moleküls abhängt (4-6 pro Mdal) (*FALKOW*, 1975). Liegt ein Molekül in der oc-Form (open circle) vor, ist es ebenfalls zirkulär und doppelsträngig, wobei aber ein Strang gebrochen ist; nach der extrazellulären Präparation bleibt die ursprüngliche Form erhalten, die DNA-Helix wird nicht getwistet (*CLOWES*, 1972).

Die sich durch die Bildung der oc-Form ergebenden Probleme bei der Auswertung der Gelelektrophorese werden in Punkt 3.7. dargestellt.
Lineare DNA-Moleküle entstehen durch eine mindestens einmalige Spaltung der zirkulären Formen (ccc oder oc), wie dies z.B. bei der Verdauung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgt (s.S. 22).

Bei der DNA-Präparation nach *FALKOW* beträgt die Ausbeute an Plasmid-DNA ca. 50%. Trotz der selektiven Fällung der hochmolekularen chromosomalen DNA in Gegenwart von SDS und einer hohen NaCl-Konzentration werden ungefähr 10% von dieser in den gereinigten Lysaten (cleared lysates) gefunden.
Die Beseitigung der Proteine aus letzteren bereitete bei einigen Stämmen Schwierigkeiten. Die Phenolextraktion mußte bis zu 3 mal wiederholt werden, um eine möglichst eiweißfreie, klare wässrige Phase zu erhalten. Erst so konnte ein ungestörter Lauf auf dem Agarose-Gel erzielt werden. Auf der anderen Seite war man bestrebt, so wenig Phenol wie möglich einzusetzen, da dieses die DNA von der ccc- in die oc-Form überführt.

Bei der Präparation von ColE1-DNA wurde eine wesentlich größere Ausbeute an Plasmid-DNA erzielt, wenn man den Trägerstamm zunächst 5 Stunden in NI-Bouillon anzüchtete, dann Chloramphenicol in einer Konzentration von 100 µg/ml Kulturmedium hinzufügte und weitere 10 Stunden schüttelte (*CLEWELL*, 1972); Chloramphenicol bewirkt in diesem Fall eine Erhöhung der Plasmidkopienzahl in der Zelle.

3.7. Gelelektrophorese

Nach den Untersuchungen von *AAIJ/BORST* (1972) und *MEYERS et al.* (1976) ist die Wanderungsgeschwindigkeit von Plasmid-DNA-Molekülen durch Agarosegele umgekehrt proportional zu ihren Molekulargewichten. Daher kann die Gelelektrophorese nicht nur zum Nachweis und zur Trennung von Plasmiden eingesetzt werden, sondern auch zu deren Molekulargewichtsbestimmung. Diese wurde durch die Verwendung von Plasmid-DNA mit bekannten Molekulargewichten ermöglicht.

Tab.9 gibt eine Übersicht über die eingesetzten Marker-Plasmide und deren Molekulargewichte wieder.

Tab.9. Marker-Plasmide und ihre Molekulargewichte

Bezeichnung des Plasmids	Plasmidgene	Molekulargewicht (Mdal)
pRI46	Tra^+	20.6
	$Ap^r Sm^r Su^r$	9.34
	kryptisch	2.67
rBP1	$Sm^r Su^r$	4.1
RSF1010	$Sm^r Su^r$	5.7
ColE1	Cel	4.2

Trägt man den Logarithmus der relativen Wanderungsgeschwindigkeit (Wanderungsstrecke) der Marker-Plasmide gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte auf, so ergibt sich ein linearer Kurvenverlauf; das Aufstellen einer solchen Eichkurve nach jeder Elektrophorese erbrachte jeweils durch Interpolation die Werte der Molekulargewichte der getesteten Plasmide (Abb.3).

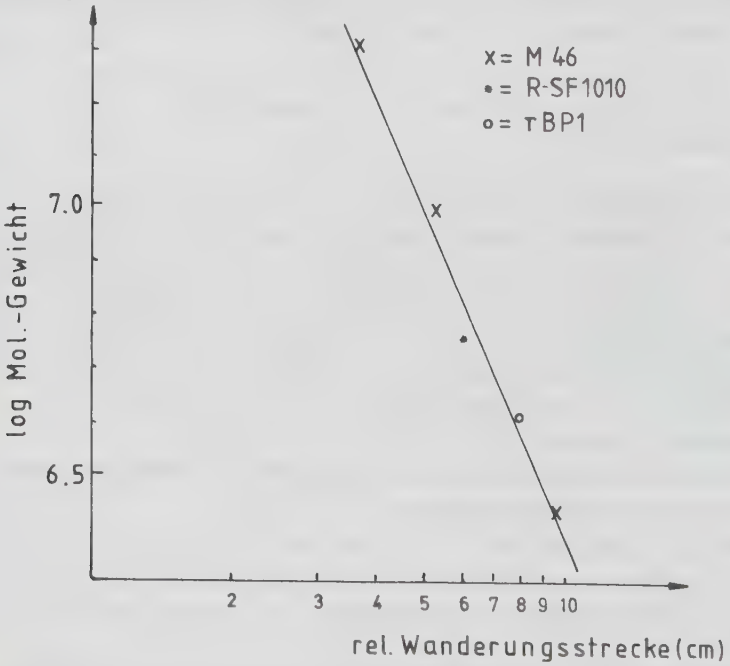

Abb.3. Molekulargewicht in Abhängigkeit von der relativen Wanderungsstrecke der Standard-Plasmide

Bei allen Teststämmen konnten in der Gelelektrophorese Plasmide nachgewiesen werden.
Abb.4 zeigt den Lauf von Plasmiden einiger Wildstämme und Marker-Plasmide in der Gelelektrophorese.

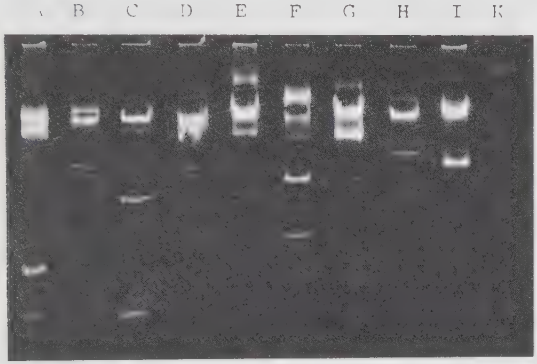

Abb.4. Gelelektrophorese von R-Plasmiden unterschiedlicher Herkunft
A-F: Plasmide aus Wildstämmen
G: RSF1010
H: ColE1
I: rBP1
K: M46-Standard-Plasmide

Ein großes Problem bei der Elektrophorese stellten die Schwankungen der einzelnen Werte für die Molekulargewichte der Plasmide in den einzelnen Elektrophoreseläufen und die exakte Bestimmung der in den DNA-Präparationen vorhandenen Anzahl an verschiedenen Plasmiden dar.
Die Ungenauigkeit der Bestimmungen kann auf folgenden Ursachen beruhen:
Der Gelelektrophoreselauf von Plasmiden wird durch Proteine gestört; sie behindern u.a. das Einwandern der DNA-Moleküle in das Gel. Auf diese Weise können Plasmide gleicher Molekülgröße unterschiedlich weit wandern und so verschieden große Molekulargewichte "vortäuschen". Da DNA-Präparationen aus Wildstämmen wesentlich pro-

teinreicher als solche aus Laborstämmen sind, gelingt die vollständige Beseitigung der Eiweiße nicht immer, so daß die aus Wildstämmen isolierten Plasmide oft einen unregelmäßigen Lauf zeigen. Im Gegensatz dazu zeigt Abb.5 (S.42) einen Gelelektrophoreselauf von Plasmiden, die zunächst auf den Laborstamm E.coli W3110 transformiert und dann aus diesem isoliert wurden. Die Banden sind relativ scharf und Plasmide gleicher Molekülgröße liegen auf einer Höhe.

Wie in Punkt 3.6 schon erwähnt, werden die Proteine aus den "cleared lysates" durch Phenolextraktion entfernt. Diese mußte bis zu 3 mal wiederholt werden, um eine eiweißfreie Phase zu erhalten. Andererseits überführt Phenol die Plasmid-DNA aus der ccc- in die oc-Form. Die Gelelektrophorese gestattet keine Unterscheidung zwischen oc- und ccc-DNA; es war also möglich, daß oc- und ccc-DNA miteinander verwechselt und so falsche Molekulargewichte ermittelt wurden, da die elektrophoretische Mobilität der beiden Konfigurationen verschieden ist. Bei Verdacht auf Vorliegen eines bestimmten Plasmids in 2 Molekülformen wurde nach *MEYERS et al.* (1976) und *AAIJ* und *BORST* (1972) so verfahren, daß die obere der beiden Banden als die oc-DNA angesehen wurde.

Beim Lauf "E" (Abb.4) wurde zum Beispiel die über der chromosomalen DNA sichtbare Bande als oc-Form des 7.2 Mdal-Plasmids aufgefaßt.
Bei den Läufen "G" (RSF1010) und "H" (ColE1) sind ebenfalls oc-Banden erkennbar; hier ist die Deutung relativ sicher, da die Trägerstämme nur ein Plasmid besitzen.
Aus den dargelegten Gründen ist ersichtlich, daß die Zahl der wiederholten Phenolextraktionen sehr oft einen Kompromiß erfordern wird zwischen dem Bestreben, die Proteine möglichst vollständig zu entfernen und der Gefahr, oc-DNA zu erhalten.

Unterschiedliche DNA-Konzentrationen in den einzelnen Präparationen derselben Plasmid-DNA können bei gleichen Versuchsbedingungen zu einer unterschiedlichen Lage der Banden in den Agarosegelen führen (*MEYERS et al.*, 1976). Zu hohe DNA-Konzentrationen bedingen

weniger weit eingewanderte Banden und verursachen eine Abweichung vom "richtigen" Molekulargewicht bis zu 10%, was sich besonders bei hohen Werten bemerkbar macht. Zudem erschweren dicke Banden ein Abmessen der Wanderungsstrecke, wie es bei Lauf "G" in Abb.4 deutlich wird.
Zu niedrige DNA-Konzentrationen erschweren den Nachweis von Plasmid-Banden oder machen ihn gar unmöglich. In Abb.4 sind beim Lauf "A" im Bereich zwischen 2 und 5 Mdal drei Banden kaum sichtbar. Hier sind zwei Läufe mit einer niedrigeren und einer höheren DNA-Konzentration notwendig, um die drei schwachen Plasmid-Banden stärker hervortreten zu lassen bzw. die zu dicke 5.9 Mdal-Bande zu verschmälern, um einen schärferen Meßpunkt für die Wanderungsstrecke zu bekommen.

Kontaminierende, chromosomale Fragmente der "Falkow-Präparation" stören u.U. den Nachweis von ccc-Plasmid-DNA. In Lauf "D" wird das 6 Mdal-Plasmid von der chromosomalen DNA verdeckt; eine längere Laufzeit würde eine Auftrennung bewirken.

Einen weiteren Unsicherheitsfaktor stellt die Dauer der Laufzeit der Elektrophorese dar. Die angelegte Spannung bleibt bei allen Gelelektrophoresen bei Benutzung desselben Gerätes konstant. Wird die Laufzeit zu lang gewählt, wandern kleine Moleküle sehr weit ein, so daß die Möglichkeit besteht, daß diese das gesamte Gel durchqueren und nach Anfärbung mit Ethidiumbromid unter dem UV-Licht nicht mehr nachweisbar sind.
Ist die Laufzeit zu kurz gewählt, wandern, wie in Abb. 4 zu sehen ist, große Moleküle nicht oder nur sehr wenig in das Gel ein und lassen eine exakte Molekulargewichtsbestimmung nicht zu.

Aufgrund der dargelegten Unsicherheiten bei der Gelelektrophorese waren mehrere DNA-Präparationen und Elektrophoresen unumgänglich; bei letzteren wurden Zeiten und DNA-Konzentrationen variiert.

Die in Tab.10 aufgeführten Molekulargewichte stellen Mittelwerte von bis zu 7 Messungen dar.

Tab.10. Molekulargewichte der aus den untersuchten Teststämmen isolierten R-Plasmide

Stamm	Molekulargewichte (Mdal)							
019632	50	7.0	4.8	4.2				
019809	45			4.1				
019393	39	7.2			3.1			
007870	32		5.9	4.0	2.9		1.8	1.4
018438c	32	6.9		4.1	3.1			
018488a	33		4.9	4.0	3.0	2.7	2.0	1.6
018561	31			4.0				
018567	31		6.2	4.0				
018592	33			4.1				
018617			5.0	4.0	3.2		2.1	

Bei 9 von 10 Stämmen lagen Plasmidmoleküle von ca. 4 Mdal Größe vor, was dem Molekulargewicht von rBP1 entspricht. Bei E.coli 018617 wurde kein Plasmid größer als 5 Mdal gefunden.

3.8. Transformation

Zur näheren Charakterisierung der 4 Mdal-Plasmide war es notwendig, sie von anderen Plasmiden zu trennen.
Durch Transformation ist es möglich, Plasmide einzeln in plasmidfreie Wirtszellen zu übertragen, in denen ihre spezifischen Eigenschaften genauer analysiert werden können. So ist es möglich festzustellen, ob die SmSu-Determinante auf dem 4 Mdal-Plasmid lokalisiert ist.

Die 4 Mdal großen Plasmide der Stämme 018438c, 018561, 018567, 018592, 018617 und 007870 wurden mit der auf S.21 beschriebenen Methode von *THURING et al.* (1975) aus dem Gel herausgeschnitten und nach *COHEN et al.* (1972) auf den SmSu-sensiblen Rezipienten E.coli W 3110 $Nx^r lac^-$ übertragen.
Da die geringe Ausbeute an Plasmid-DNA beim Ausschneiden der Ban-

den aus dem Agarosegel sich im Laufe der Versuche als problematisch erwies, wurde bei den Stämmen 018488a, 019632, 019809 und 019393 folgendermaßen verfahren:

Wie bei den anderen Stämmen wurde die DNA durch "Falkow-Präparation" gewonnen. Im EB/CsCl-Dichtegradienten wurde die Plasmid- von der chromosomalen Fraktion getrennt.
Mit der Gesamt-Plasmid-DNA wurde der E.coli transformiert; die Wahrscheinlichkeit, daß mehr als 1 Plasmid-DNA-Molekül in die Zelle eindringt, ist sehr gering.
Die Selektivierung geschah bei beiden Methoden auf Sm- bzw. Su-haltigen Chinablau-Lactose-Agarplatten. Bei der 2. Methode wurde statt 200 µg/ml eine Sulfonamid-Konzentration von 500 µg/ml gewählt, was bei der hohen Resistenz berechtigt war.
Die Reinigung der Transformanten erfolgte durch wiederholte Überimpfung auf den gleichen Selektivagar, der zusätzlich mit Nx versetzt war (chromosomale Resistenz der Rezipienten).

Der Agardiffusionstest zeigte, daß mit einer Ausnahme die Transformanten gegen Sm und Su resistent waren und andere Resistenzeigenschaften der Wildstämme nicht übertragen worden waren. Der Transformant, der die Plasmid-DNA vom Stamm 019393 erhalten hatte, war neben Sm/Su- auch Ap-resistent.

Um feststellen zu können, welche Plasmide aus den Wildstämmen dem Sm/Su- bzw. dem Sm/Su/Ap-Plasmid in den Transformanten zuzuordnen sind, mußten die Plasmide aus den Transformanten isoliert und ihr Molekulargewicht gelelektrophoretisch bestimmt werden.
Bei 9 von 10 Transformanten wurden Plasmide von der Größe 4 Mdal gefunden. Beim Stamm 019393, bei dessen Transformanten eine zusätzliche Ampicillin-Resistenz aufgetreten war, war ein Plasmid der Größe 7.2 Mdal übertragen worden.

3.9. *Charakterisierung der aus den Transformanten isolierten Plasmide durch Restriktionsenzyme*

Für die Enzymverdauung mußte die Plasmid-DNA frei von chromosomaler DNA sein. Die Trennung erfolgte durch die EB/CsCl-Dichtegradientenzentrifugation von DNA, die durch "Falkow-Präparation" aus den Transformanten gewonnen worden war.
Abb.5 zeigt die von chromosomaler DNA gereinigten Plasmide: Moleküle gleicher Größe liegen auf gleicher Höhe (A, C-E); das Plasmid ColE1 mit 4.2 Mdal (B) ist nicht ganz so weit gewandert wie die anderen Plasmide mit 4.1 Mdal.
Über den Plasmidbanden sind noch Reste der oc-Form zu erkennen, die aber bei der Verdauung nicht stören.

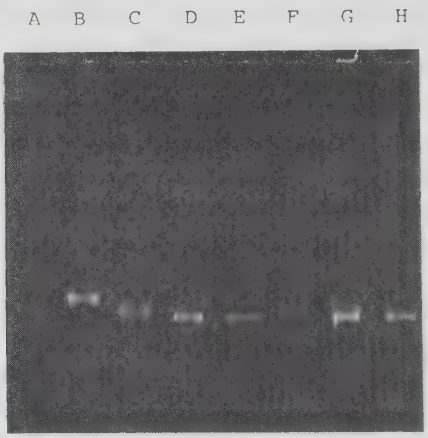

Abb.5. Gelelektrophorese gereinigter Plasmid-DNA
A: rBP1
B: ColE1
C-H: 4.1 Mdal-Plasmide der Teststämme

Die enzymatischen Verdauungen lieferten folgende Ergebnisse:

1. Bei der EcoRI-Verdauung wurden alle 4.1 Mdal Plasmide der Teststämme genau wie das Plasmid rBP1 einmal geschnitten; auf dem

Gel war jeweils eine Bande mit einer Größe von 4.1 Mdal zu sehen. ColE1 wurde ebenfalls nur einmal geschnitten (Abb.6). RSF1010 lieferte zwei Fragmente mit 5 und 0.7 Mdal.

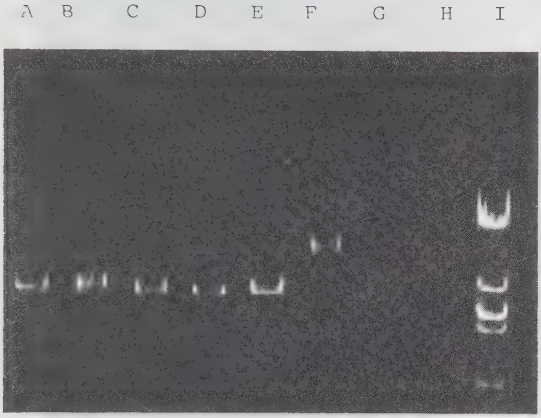

Abb.6. Agarosegelelektrophorese von mit EcoRI verdauter und unverdauter Plasmid-DNA aus Transformanten
A-D: verdaute Testplasmide
E: ColE1 verdaut
F: ColE1 unverdaut
G: rBP1 verdaut
H: rBP1 unverdaut
I: λ-Standard-Plasmide

2. Nach der PSTI-Verdauung zeigten die 4.1 Mdal-Plasmide der Teststämme und das Plasmid rBP1 wiederum ein einheitliches Bandenmuster. Es lagen je zwei Fragmente von 2.0 und 2.1 Mdal Größe vor. RSF1010 und ColE1 wurden von PSTI auch zweimal geschnitten, wiesen aber Fragmente mit anderen Molekülgrößen auf (Abb.7).

A B C D E F G H I K L M

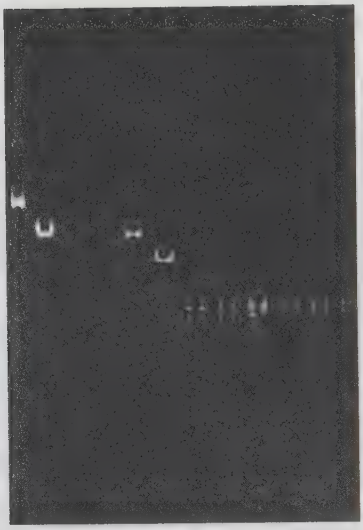

Abb.7. Agarosegelelektrophorese von mit PSTI verdauter Plasmid-DNA und unverdauter DNA

A: RSF1010 unverdaut
B: RSF1010 verdaut
C: rBP1 unverdaut
D: rBP1 verdaut
E: ColE1 unverdaut
F: ColE1 verdaut
G-M: verdaute Plasmide

Die Notwendigkeit der Verwendung mehrerer Restriktionsenzyme zeigt sich am Beispiel von ColE1. Es verfügt über ein ähnliches Molekulargewicht wie rBP1 und wird durch EcoRI auch nur einmal geschnitten. Erst durch die PSTI-Verdauung zeigen sich Unterschiede im Bandenmuster und damit in der molekularen Struktur.

3. Die HindII-Verdauung lieferte wiederum das gleiche Ergebnis, daß sowohl die 4.1 Mdal-Plasmide der Teststämme als auch rBP1 4 mal geschnitten wurden. Es entstanden je vier Fragmente mit

Größen von 1.7, 1.3, 0.5 und 0.4 Mdal (Abb.8).

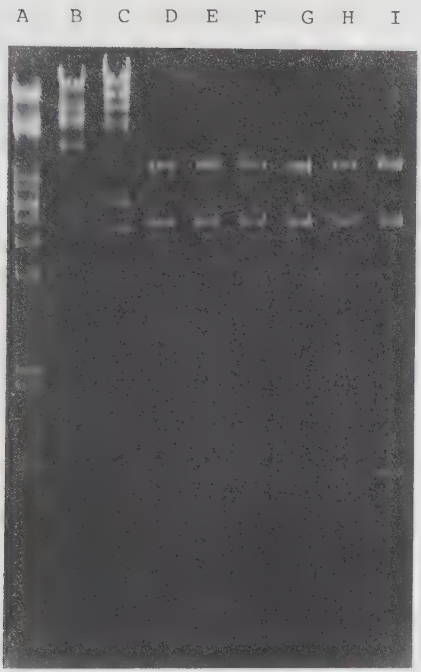

Abb.8. Agarosegelelektrophorese von mit HindII verdauter Plasmid-DNA
A: λ-PSTI
B: λ-EcoRI
C: λ-HindIII
D: rBP1
E-I: Testplasmide verdaut

Beim 7.2 Mdal-Plasmid des Stammes 019393 zeigte die Gelelektrophorese nach HindII-Verdauung sechs Fragmente, von denen vier mit den HindII-Fragmenten der Sm/Su-Plasmide der anderen Teststämme übereinstimmten.
Dieser Stamm trägt dieselben Resistenzgene für die Sm/Su-Resistenz, aber zusätzlich noch einen Genabschnitt für die Ampicillin-Resistenz, das Transposon TnA (*VAN TREECK*, 1979).

4. DISKUSSION

MANNHEIM et al. (1979) stellten bei der Auswertung der Resistenzmuster von 2.274 E.coli-Stämmen fest, daß 43% aller klinischen E. coli-Isolate streptomycinresistent sind und daß 38% der resistenten Stämme gleichzeitig auch Resistenz gegenüber Sulfonamid aufweisen. Die weite Verbreitung der Streptomycinresistenz ist insofern ein interessantes Phänomen, als in Europa schon lange Streptomycin in der Therapie von Infektionskrankheiten weitgehend durch andere Antibiotika ersetzt ist. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß bei einer stabilen Kopplung von Sm- und Su-Resistenzgenen unter der Therapie mit Sulfonamiden, wie sie vor allem in der Ambulanz verbreitet ist, Sm-Resistenzgene mit selektioniert werden.

Da Sm- und Su-Determinanten genetisch sehr häufig gekoppelt sind (*MILLIKEN et al.*, 1973) und einen hohen Anteil an den natürlich vorkommenden R-Plasmiden stellen, war es interessant zu wissen, ob das Plasmid rBP1 mit gekoppelter Sm/Su-Resistenz (zuerst in Frankfurt aus Bakterien einer freiwilligen Versuchsperson isoliert) mit denen anderer Versuchspersonen und anderorts übereinstimmt oder nur ein "Einzelfall" war.
Zu diesem Zweck sind 10 Sm/Su-resistente Stämme aus einem Kollektiv von 430 E.coli-Stämmen untersucht worden. Alle Sm/Su/Spec-resistenten Stämme sind von der Untersuchung ausgeschlossen worden, weil solche Stämme mit großer Wahrscheinlichkeit keine Aminoglykosid-Phosphotransferase APH-(3"), sondern die Adenyltransferase AAD-(3") bilden und damit eine Bedingung für die Identität mit dem Plasmid rBP1 nicht erfüllt wäre.
Bei 9 von 10 untersuchten E.coli-Stämmen (von Patienten der Bonner Universitätskliniken) wurden Plasmide mit einem Molekulargewicht von 4.1 Mdal gefunden, in einem Fall ein Plasmid mit einer zusätzlichen Ampicillin-Resistenz und einem Molekulargewicht von 7.2 Mdal. Dieses Plasmid trägt die gleichen Sm/Su-Resistenzgene wie das Plasmid rBP1 und enthält darüber hinaus das Transposon TnA mit dem Ap-Gen (*VAN TREECK et al.*, 1979).
Alle Sm/Su-Plasmide codieren das gleiche Sm-inaktivierende Enzym,

die Phosphotransferase APH-(3").
Alle Sm/Su-Plasmide werden durch die Restriktionsendonukleasen EcoRI, PSTI und HindII in gleicher Weise geschnitten.
Die Tatsache, daß die Plasmide jeweils das gleiche Genprodukt, d.h. die gleiche Phosphotransferase codieren und das gleiche Restriktionsmuster wie das Plasmid rBP1 aufweisen, zeigt eine große Homologie der untersuchten Plasmide. Mittels der angewandten Untersuchungsmethoden sind die untersuchten Plasmide mit dem Plasmid rBP1 als identisch anzusehen. Weiterführende Untersuchungen der DNA wie Hybridisierung der verschiedenen Plasmide untereinander und eine Analyse der Nukleotid-Basensequenz könnten eine absolute Identität beweisen.

Andere Autoren interessierten sich ebenfalls für R-Faktor codierte, gekoppelte Sm/Su-Resistenz.
BARTH und *GRINTER* (1974) beschreiben SmSu-Plasmide, die aus Bakterien verschiedener Spezies und geographisch unterschiedlichen Orten isoliert worden sind.
9 der 12 von ihnen untersuchten Plasmide hatten ein Molekulargewicht von 5.7 Mdal, je ein weiteres 6.3 bzw. 9.2 Mdal. Das 12. Plasmid, PB165, lag in Form von 3 Supercoil-DNA-Spezies mit Molekulargewichten von 7.4, 14.7 und 21.4 Mdal vor.
10 der 12 Plasmide wiesen wie das Plasmid rBP1 nur eine Schnittstelle für EcoRI auf (*GRINTER*, *BARTH*, 1976). Das 9.2 Mdal-Plasmid wurde 3x geschnitten, PB165 wurde nach dem Verdauen mit EcoRI zu einer einzigen Molekülgröße von 7.6 Mdal reduziert. Hier lagen offensichtlich Oligomere vor.
Interessant wäre es zu prüfen, ob die von *BARTH* und *GRINTER* charakterisierten SmSu-Plasmide dieselbe genetische Information tragen und zum Beispiel die gleichen Sm inaktivierenden Enzyme codieren wie rBP1, obwohl die Molekulargewichte der Plasmide unterschiedlich sind.

KAWABE et al. (1978) untersuchten ebenfalls Plasmide mit gekoppelter SmSu-Resistenz und verglichen den biochemischen Mechanismus der Sm-Resistenz von konjugativen und nicht-konjugativen Plasmiden. Die Plasmide waren von wahllos aus ihrem Laborkollektiv ausgesuch-

ten E.coli- und Shigella-Stämmen isoliert worden. Die Molekulargewichte von 6 der 8 nicht-konjugativen Plasmide lagen zwischen 4.9 und 5.6 Mdal, waren also wie die meisten von *BARTH* und *GRINTER* beschriebenen SmSu-Plasmide um ca. 1 Mdal größer als das Plasmid rBP1. *KAWABE et al.* fanden heraus, daß bei allen nicht-konjugativen Plasmiden, unabhängig von der Spectinomycin-Empfindlichkeit der Zellen, das Streptomycin immer durch Phosphorylierung inaktiviert wird. Diese Tatsache ließe die Vermutung zu, daß in dem aus Bonner Kliniken stammenden Bakterienmaterial das Plasmid rBP1 häufiger als angegeben vorkommen könnte, nämlich auch bei solchen Stämmen, die Sm/Su- und Spec-resistent sind (vgl. Tab. 5) und so mit einer Häufigkeit größer als 10% anzutreffen wären. *KAWABE* kommt am Schluß zu einer Klassifizierung der SmSu-Plasmide:

Gruppe 1:	Sm^rSpec^r	Inaktivierung des Sm durch Adenylierung
Gruppe 2:	Sm^rSpec^s	Inaktivierung des Sm durch Phosphorylierung
Gruppe 3:	Sm^rSpec^r	Inaktivierung des Sm durch Phosphorylierung

Konjugative Plasmide gehören in die Gruppe 1 oder 2, wobei die meisten in der ersten Gruppe zu finden sind.
Nicht-konjugative Plasmide gehören zur Gruppe 2 oder 3, wie zum Beispiel auch das Plasmid rBP1.

ELKHOULY (1979) konnte ebenfalls in 8 von 32 aus Ägypten stammenden E.coli-Stämmen Plasmide vom Typ rBP1 nachweisen. Allerdings wurden diese Bakterien von Patienten isoliert, die mit Streptomycin behandelt worden waren. Streptomycin wird im Gegensatz zu Europa in Ägypten häufig in der Therapie eingesetzt und kann somit einen Selektionsdruck ausüben. Das Ausmaß der Streptomycinresistenz in diesen beiden somit ökologisch unterschiedlichen Bereichen kann nicht miteinander verglichen werden. Daß in beiden Bereichen eine epidemiologisch andere Situation vorherrscht, darauf deuten die Untersuchungen von *ELKHOULY* auch insofern hin, als er bei 31 von 32 untersuchten Sm-resistenten E.coli-Stämmen Aminoglykosid-Phosphotransferasen vom Typ APH-(3") fand. In einem aus dem Bonner Raum isolierten Bakterienkollektiv hingegen sind Adenyltransferasen vom Typ AAD-(3") 3-4mal häufiger anzutreffen als Phosphotransferasen (*WIEDEMANN et al.*, 1979). Eine mögliche Erklä-

rung könnte sein, daß Spectinomycin in Ägypten nicht eingesetzt wird und somit Spec-resistente Bakterienstämme nicht selektioniert werden.

Die Tatsache, daß das Plasmid rBP1 zuerst in einem Frankfurter Stamm entdeckt wurde, zeigt, daß sein Auftreten in Stämmen des Bonner Raumes keine epidemiologische Zufälligkeit darstellt. Um seine wirkliche Bedeutung für die Epidemiologie erfassen zu können, wäre es notwendig, Bakterienstämme verschiedener geographischer Gebiete auf Plasmide dieses Typs hin zu untersuchen, zumal diese auch aus ägyptischen E.coli-Stämmen isoliert werden konnten.

Interessant wäre es, die Frage zu prüfen, wie die Verbreitung des Plasmids rBP1 vonstatten ging, d.h. sind die in Ägypten, Frankfurt und Bonn entdeckten Plasmide gleichen Ursprungs und durch Verschleppung "verstreut" worden oder entwickelten sie sich getrennt an Ort und Stelle. Eine Beantwortung wird sehr schwer, wahrscheinlich unmöglich sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Aus einem Bakterienkollektiv von 130 E.coli-Stämmen, die von Patienten der Bonner Universitätskliniken stammen, waren 11 Stämme Streptomycin- und Sulfonamid-resistent und Spectinomycin-sensibel.

Die 10 untersuchten Stämme trugen das Plasmid rBP1.
Ein Stamm besaß zusätzlich zur Streptomycin- und Sulfonamidresistenz einen Genabschnitt, das Transposon TnA, das für Ampicillinresistenz kodiert.

Die Identität der SmSu-Plasmide wurde mit folgenden Kriterien bewiesen:

1. Die Plasmide kodieren alle eine Sm- und Su-Resistenz.
2. Das Streptomycin wird in allen Fällen durch die Phosphotransferase APH-(3") inaktiviert.
3. Die Plasmide weisen alle das gleiche Molekulargewicht von 4.1 Mdal auf.
4. Bei der Charakterisierung der Plasmide durch die Restriktionsendonukleasen EcoRI, PSTI und HindII ergaben sich immer die gleichen "Restriktionsmuster".

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AAIJ, C., P. BORST (1972)
The gel electrophoresis of DNA. Biochem. Biophys. Acta 269, 192-200

2. AKIBA, T., T. KOJAMA, Y. ISSHIKI, S. KIMURA, T. FUKUSHIMA (1960)
Studies on the mechanism of development of multiple drug resistent Shigella strains. Nihon Iji Shimpo 1866, 46-50

3. ANDERSON, E.S., M.J.LEWIS (1965)
Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in Salmonella thyphimurium. Nature (London) 208, 843-849

4. ANDERSON, J.D., W.A. GILLESPIE, M.H. RICHMOND (1973)
Chemotherapie and antibiotic-resistance transfer between Enterobacteria in the human gastrointestinal tract. Journal Med. Microbiol. 50, 461-473

5. BARTH, P.T., N.J. GRINTER (1974)
Comparison of the deoxyribonucleic acid molecular weights and homologies of plasmids conferring linked resistance to streptomycin and sulfonamides. Journal of Bacteriology 120, 618-630

6. BENVENISTE, R., J.DAVIES (1971)
R-factor mediated Gentamycin resistance: a new enzyme which modifies aminoglycoside antibiotics. Febs-Letters 14, 293-296

7. BENVENISTE, R., T. YAMADA, J. DAVIES (1970)
Enzymatic adenylation of streptomycin and spectinomycin by R-factor-resistant Escherichia coli. Infection and Immunity 1, 109-119

8. CAMPBELL, A., D.E. BERG, D. BOTSTAIN, E.M. LEDERBERG, R.P. NOVICK, P. STARLINGER, W. SZYBALSKI (1979)

Nomenclature of transposable elements in procaryontes. Gene 5, 197

9. *CLEWELL, DON B.* (1972)
Nature of ColE1 plasmid replication in E.coli in the presence of chloramphenicol. Journal of Bacteriology 110, 667-676

10. *CLOWES, R.C.* (1972)
Molecular structure of bacterial plasmids. Bacteriol. Rev. 36, 361-405

11. *COHEN, S.N., A.C.Y. CHANG, L. HSU* (1972)
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2110-2114

12. *DAWSON, M.H., R.H.P. SIA* (1931)
J. exp. Med. 54, 681; zitiert nach:
BRESCH, C., HAUSMANN, R. (1970)
Klassische und molekulare Genetik, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

13. *DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V.:* Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Myobakterien) gegen Chemotherapeutika. Entwurf November 1976, DIN 58940, Teil 3. Beuth Verlag, Berlin 1976

14. *ELKHOULY, A.E., B. WIEDEMANN* (1979)
Nature of streptomycin resistance in Enterobacteria from faeces of streptomycin treated patients in Egypt. Publikation in Vorbereitung.

15. *ERBACHER, H.* (1977)
Dissertation im Fachbereich Humanmedizin, Universität Frankfurt.

16. *FALKOW, S.* (1975) Infectious multiple drug resistance. Pion Limited, London

17. *GRIFFITH, F.* (1928)
J.Hyg. (London) 27, 113; zitiert nach: *BRESCH, C., HAUSMANN, R.* (1970) Klassische und molekulare Gentik, 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

18. *GRINTER, N.J., P.T. BARTH* (1976)
Characterization of SmSu plasmids by restriction endonuclease cleavage and compatibility testing. Journal of Bacteriology 128, 394-400

19. *GRINSTED, J., J.R. SAUNDERS, L.C. INGRAM, R. SYKES, M.H. RICHMOND* (1972)
Properties of a R-factor which originated in Pseudomonas aeruginosa 1822. Journal of Bacteriology 110, 529-537

20. *GUERRY, P., D.J. LEBLANC, S. FALKOW* (1973)
General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. Journal of Baacteriology 116, 1064-1066

21. *HEFFRON, F., C. RUBENS, S. FALKOW* (1975)
Translocation of a plasmid DNA sequence which mediates ampicillin resistance: molecular nature and specificity of insertion. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 3623-3627

22. *HENZEL, A.* (1976)
Enterobacteriaceae als Vektor für Hospitalinfektionen. Dissertation im Fachbereich Humanmedizin, Universität Frankfurt

23. *HERSHFIELD, V., H.W. BOYER, C. YANOFSKY, M.A. LOVETT, D.R. HELINSKY* (1974)
Plasmid ColE1 as a molecular vehicle for

cloning and amplification of DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3455-3459

24. *KAWABE, H., T. TANAKA, S. MITSUHASHI* (1978)
Streptomycin and spectinomycin resistance mediated by plasmids. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 13, 1031-1035

25. *KAYSER, F.H.* (1977)
Mechanismus der Resistenz gegen Chemotherapeutika bei Bakterien. Folia chemotherapeutika, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen

26. *KIDA, M., T. ASAKO, M. YONEDA, S. MITSUHASHI* (1975)
Microbial Drug Resistance, ed. by *S. MITSUHASHI* and *H. HASHIMOTO*. University of Tokyo Press, Tokyo/ University Park Press, Baltimore and London; zitiert nach:
MITSUHASHI, S., S. YAMAGISHI., T. SAWAI, H. KAWABE (1977)
Biochemical mechanisms of plasmid-mediated resistance. R-Factor Drug Resistance, ed. by *S.MITSUHASHI*, 195-242. University Park Press, Baltimore - London - Tokyo

27. *KLAER, R.* (1978)
Diplomarbeit. Institut für Genetik, Universität Köln

28. *LAMBRECHT, E.* (1977)
Dissertation im Fachbereich Humanmedizin, Universität Frankfurt

29. *LEDERBERG, J., E.L. TATUM* (1946)
Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. Nature (London) 158, 558

30. *LURIA, S.E., M. DELBRÜCK* (1943)
Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics 28, 491-511

31. *MANDEL, M., A. HIGA* (1970)
Letter to the editor: Calciumdependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53, 159-162

32. *MANNHEIM, W., W. REHM* (1979)
Publikation in Vorbereitung; zitiert nach: *WIEDEMANN, B., G. TETZLAFF, U. VAN TREECK* (1979)
Die Ausbreitung von Aminoglykosid-Transferasen bei gramnegativen Bakterien. International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy 17, 138-144.

33. *MEYER, H., W. GOEBEL*
Boehringer Mannheim GmbH-Biochemica
Anweisung des Herstellers zur Restriktionsendonuklease EcoRI

34. *MEYERS, J.A., D.SANCHEZ, LYNN P. ELWELL, S. FALKOW* (1976)
Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. Journal of Bacteriology 127, 1529-1537

35. *MILLIKEN, C.E., R.C. CLOWES* (1973)
Molecular structure of a R factor, its component drug-resistance determinants and transfer factor. J. Bacteriol. 113, 1026-1033

36. *MITSUHASHI, S., S. YAMAGISHI, T. SAWAI, H. KAWABE* (1977)
Biochemical mechanisms of plasmid-mediated resistance. In R Factor Drug Resistance, ed. by *S.MITSUHASHI*, 195-242. University Park Press, Baltimore - London - Tokyo

37. *MURRAY, K., N.E. MURRAY* (1975)
Phage lambda receptor chromosomes for DNA fragments made with restriction endonuclease III of Haemophilus influenzae and restriction endonucleaseI of E.coli. J.mol.biol. 98, 551-564

38. *NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS* (1976)
Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Villanova, USA

39. *NOSSAL, N.G., L.A. HEPPEL* (1966)
The release of enzymes by osmotic shock from Escherichia coli in exponential phase. Journal of Biological Chemistry 241, 3055-3062

40. *OCHIAI, K., K. YAMANAKA, K. KIMURA, O. SAWADA* (1959)
Studies on inheritance of drug resistance between Shigella strain and Escherichia coli strains. Nihon Iji Shimpo 1861, 34-36

41. *OZANNE, B., R. BENVENISTE, D. TIPPER, J. DAVIES* (1949)
Aminoglycoside antibiotics: inactivation by phosphorylation in Escherichia coli carrying R factor. J. of Bacteriology 100, 1144-1146

42. *PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT FÜR CHEMOTHERAPIE E.V., ARBEITSGEMEINSCHAFT "RESISTENZ"* (1978)
Empfindlichkeitsprüfung klinischer Isolate einiger Enterobacteriaceae sowie von Pseudomonas aeruginosa, Staphylokokkus aureus und Streptokokkus faecalis gegenüber Chemotherapeutika. Infection 6, 35-44

43. *ROBERTS, J. RICHARD* (1978)
Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. Gene 4, 183-193

44. *ROBINSON, L.H., A. LANDY* (1977)
HindII, HindIII and HpaI restriction fragment maps of the left arm of bacteriophage lambda DNA. Gene 2 (1), 33-54

45. *SCHIEFERDECKER, F.* (1977)
Genetische Charakterisierung von R-Plasmiden unterschiedlicher Herkunft. Diplomarbeit Math.-Nat. Fakultät Universität Bonn

46. *SMITH, H. WILLIAMS* (1969)
Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of E.coli to resident E.coli in the alimentary tract of man. Lancet 1, 1174

47. *SUZUKI, I., N. TAKAHASHI, S. SHIRATO, H. KAWABE, S. MITSUHASHI* (1975)
Adenylation of streptomycin by Staphylococcus aureus: a new streptomycin adenyllyl transferase. In Microbiol Drug Resistance, ed. by *S.MITSUHASHI* and *H.HASHIMOTO*, 463-473, University of Tokyo Press. Tokyo /University Press, Baltimore and London

48. *TETZLAFF, G.* (1979)
Dissertation. Math.-Nat.-Fakultät, Universität Bonn

49. *THOMAS, M., R.W. DAVIS* (1975)
Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with EcoRI restriction endonuclease. J. Mol. Biol. 91, 315-328

50. *THURING, R.W.J., J.P.M. SAUNDERS, R. BORST* (1975)
A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. Analyt. Biochem. 68, 213-220

51. *VAN EMBDEN, J.D.A.* (1978)
Translocation of an ampicillin resistance determinant within a R factor aggregate in Salmonella panama. Antonie van Leewenhoek 44, 105

52. *VAN TREECK, U.* (1977)
Molekularbiologische Charakterisierung von Resistenzplasmiden unterschiedlicher Herkunft. Diplomarbeit, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn

53. *VAN TREECK, U., B. WIEDEMANN, W. KALTHOFEN* (1979)
Characterization of a SmSu-Plasmid (rBP1) frequently occuring in clinical isolates of E.coli. IV. Symposium On Antibiotic Resistance, Smolenice. Springer Verlag, in Druck

54. *VINOGRAD, J., J. LEBOWITZ, R. RADLOFF, R. WATSON, P. LAIPIS* (1965)
The twisted circular form of polyoma viral DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 1104-1111

55. *WALTER, A.M., L. HEILMEYER* (1975)
Antibiotika-Fibel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage

56. *WATANABE, T.* (1963)
Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev. 27, 87-115

57. *WIEDEMANN, B.* (1974)
Die biologische Aktivität von Resistenz-Plasmiden. Immunität und Infektion 2, 223-230

58. *WIEDEMANN, B.* (1978)
Routinetest für die Empfindlichkeitsprüfung. Immunität und Infektion 6, 209-213

59. *WIEDEMANN, B., G. TETZLAFF, U. VAN TREECK* (1979)
Die Ausbreitung von Aminoglykosid-Transferasen bei gramnegativen Bakterien. International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy 17, 138-144

60. *WILKINSON, P. J.* (1978)
Das Mikrotiter-System für die Empfindlichkeitsprüfung. Immunität und Infektion 6, 267-269

61. *ZINDER, N.D., J. LEDERBERG* (1952)
Genetic exchange in Salmonella. J. Bact. 64, 679

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ferner danke ich Frau G. Tetzlaff und Herrn U. van Treeck für Hilfe und Beratung, die sie mir bei den Enzymuntersuchungen und molekularbiologischen Experimenten gewährten.

LEBENSLAUF

Name:		*Wolfram Kalthofen*
Geburtsdatum:		18. 3. 1950
Geburtsort:		La Paz-Bolivien
Eltern:		Arthur Kalthofen, Rektor
		Helene Kalthofen, geb. Wienecke, Zahnärztin
Schulbildung:	1957-1961	Deutsche Schule "Mariscal Braun" in La Paz
	1962-1969	Städtisches mathematisch-naturwissenschaftliches und neusprachliches Gymnasium Troisdorf
	1969	am 11. Juni Abitur
Studium:	1969-1974	Studium der Chemie in Bonn und Diplom-Chemiker-Vorprüfung
	1974-1977	Studium der Humanmedizin in Erlangen
	1977-1979	Studium der Humanmedizin in Bonn
	1976	am 26. März Ärztliche Vorprüfung
	1977	am 31. März 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	1979	am 15. März 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
		ab 30. April Praktisches Jahr am Akademischen Lehrkrankenhaus in Lüdenscheid
	1980	am 22. April Ärztliche Prüfung